

Christian Karl Kuhn
Dr. med.

Untersuchungen zur Mechanotransduktion in Kardiomyozyten in vitro und vivo

Geboren am 07.09.1977 in Neustadt an der Weinstr.
Staatsexamen am 14.12.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Norbert Frey

Eine mechanische Belastung des Herzens führt zu kardialer Hypertrophie mit langfristig deletären Konsequenzen. Durch die Hypertrophie steigt das Risiko für Herzinsuffizienz, Arrhythmien und kardiovaskuläre Mortalität deutlich an. Bis heute ist unbekannt, wie die biomechanische Belastung auf zellulärer Ebene gemessen, verarbeitet und in die entsprechende Antwort umgewandelt wird.

Um die zugrunde liegenden Signalwege aufzudecken, verwendeten wir ein Zellkultur-System, in dem Kardiomyozyten auf einer elastischen Membran für 24 h gedehnt wurden. Diese Kardiomyozyten unterzogen wir einer genomweiten Genexpressionsanalyse mit Affymetrix 230.2-Microarray-Chips. Verglichen wurde das Genexpressionsprofil sowohl mit dem unbehandelten als auch mit dem mit Phenylephrin behandelten Kardiomyozyten. Phenylephrin ist ein α_1 -adrenerger Agonist und pharmakologischer Induktor der kardialen Hypertrophie. Zunächst konnte durch den „Stretch“ der Kardiomyozyten ein ähnliches Ausmaß der Hypertrophie wie durch die pharmakologische Stimulation nachgewiesen werden. Die Zellfläche der Kardiomyozyten stieg durch „Stretch“ auf das 1,88-fache und durch Behandlung mit 50 μ M Phenylephrin auf das 1,83-fache im Vergleich zu unbehandelten Zellen an.

Die Microarray-Analyse lieferte uns 164 Gene, deren Expression durch den „Stretch“ der Kardiomyozyten um mehr als das zweifache induziert worden war. Die Expression von 21 Genen wurde durch den biomechanischen Stimulus um mehr als das 0,5-fache herunterreguliert. Mittels Real Time PCR-Analysen bestätigten wir zunächst die Induktion von Vertretern des hypertrophen Genprogramms, wie die natriuretischen Peptide ANF (5,1-fach) und BNP (4,2-fach) oder FHL-1 (8,0-fach). Daneben fanden sich auch einige Gene, die bekanntermaßen durch biomechanische Belastung induziert werden. Hierzu gehören HSP70 (20,9-fach) und c-Myc (3,0-fach). Durch die Microarray-Analysen konnten wir ferner Gene identifizieren, für die eine kardioprotektive Wirkung beschrieben war. „Stretch“ verursachte eine 17,7-fache Induktion von Metallothionein 1a und eine 14,8-fache Induktion der Hämoxidase I (Hmox1). Die stärkste Regulation lag bei der Transkription des Growth-and-Differentiation-Factor-15 (GDF15, 25,9-fach) vor. Phenylephrin bewirkte bei Hmox1 und GDF15 nahezu keine Steigerung der Transkription. Für beide Gene ließ sich die Induktion auch auf Proteinebene bestätigen.

Um die Spezifität des Genexpressionsprofils durch mechanische Belastung zu überprüfen, verglichen wir die Regulation dieser Gene mit weiteren pharmakologischen Kontrollen. Hierzu stimulierten wir Kardiomyozyten mit 100 nM Endothelin-1 und 100 nM Angiotensin II für 24 h. Hierbei fiel auf, dass Hmox1, Mt1a und GDF15 zwar durch Angiotensin II, nicht aber durch Endothelin-1 induziert werden. Die Induktion von Hmox1 und GDF15 durch „Stretch“ konnte durch die gleichzeitige Behandlung der Kardiomyozyten mit 100 nM Irbesartan, einem Angiotensin-Rezeptor-Blocker, deutlich reduziert werden. Diese Experimente zeigen, dass die Regulation des dehnungsspezifischen Genexpressionsprofils zumindest teilweise durch den Angiotensin II-Rezeptor-Signalweg vermittelt ist.

In bereits publizierten Untersuchungen zum Dehnungssensor konnten einige Proteine identifiziert werden, die Teil dieser Maschinerie zu sein scheinen. Ein wichtiger Kandidat ist das Muscle LIM Protein (MLP). Wir konnten jetzt zeigen, dass biomechanischer Stress *in vitro* zu einer 1,9-fach gesteigerten Genexpression von MLP führte. Da die Hochregulation von MLP ein gegenregulatorischer Mechanismus sein könnte, der einer überschiessenden Hypertrophie entgegenwirkt, entwickelten wir ein Modell der adenoviralen Überexpression von MLP *in vitro* und einer herzspezifischen Überexpression *in vivo*.

Der adenovirale Gentransfer von MLP (AdMLP) in Kardiomyozyten führte nicht zur Hypertrophie. Die Zellgröße von mit AdGFP behandelten Kardiomyozyten war nahezu identisch zu mit AdMLP infizierten Zellen. Das Expressionsniveau von typischen Vertretern des hypertrophen Genprogramms wie ANF oder beta-MHC jedoch war in der quantitativen Real Time PCR-Analyse dosisabhängig reduziert. Ob MLP in der Lage ist, die Wirkung hypertropher Stimuli zu modulieren, versuchten wir durch die Infektion von Kardiomyozyten vor Dehnung zu überprüfen. Durch die Behandlung mit MLP kam es zu einer signifikanten Reduktion der ANF- und BNP-Expression um 17,8 bzw. 61,5% verglichen mit Zellen, die gedehnt wurden und lediglich ein Reportergen adenoviral überexprimierten. Da bereits zuvor gezeigt werden konnte, dass MLP den Calcineurin-NFAT-Signalweg moduliert, überprüften wir, ob die Überexpression von MLP zu einer Veränderung der Calcineurin-Aktivität führte. Hierzu analysierten wir die MCIP1.4-Expression, welche mit der Calcineurin-Aktivität ansteigt. Durch die Überexpression von MLP kam es unter „Stretch“-Bedingungen zu einer signifikanten Reduktion der MCIP1.4-Expression um 54,4%.

Um die Relevanz eines möglichen antihypertrophen und kardioprotektiven Effekts von MLP *in vivo* prüfen zu können, stellten wir ein transgenes Mausmodell mit herzspezifischer Überexpression von MLP her. Es konnten drei Linien generiert werden, die im Folgenden näher untersucht wurden. Die transgenen Mäuse unterschieden sich weder durch Herz- oder Körpergewicht von ihren Wildtyp-Geschwistertieren noch im Hinblick auf ihre Herzfunktion, welche von uns echokardiographisch erfasst wurde. Die Tiere wurden im Alter von zwei und sechs Monaten untersucht. Allerdings unterschied sich die Genexpression der MLP-transgenen Tiere von den Wildtyp-Geschwistertieren. Die Expression des natriuretischen Peptids BNP wurde durch die Überexpression *in vivo* um 45,1% reduziert.

Um einen potentiellen Funktionsverlust durch den c-terminalen Flag-Tag von MLP als Ursache der ausbleibenden Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren auszuschließen, unternahmen wir den Versuch, den Phänotyp der MLP-defizienten Mäuse durch eine Überexpression von MLP-Flag zu retten. Wir untersuchten männliche Wildtyp-, MLP-defiziente und MLP-defiziente Mäuse, die zugleich MLP-Flag überexprimierten. Die drei Gruppen wurden morphometrisch analysiert und zeigten einen signifikanten Anstieg des Quotienten aus Herz- und Körpergewicht in MLP-defizienten Mäusen gegenüber Wildtyp-Tieren. Durch die Überexpression von MLP-Flag in den MLPko-Mäusen konnte die Hypertrophie wieder auf das Ausgangsniveau der Wildtyp-Mäuse zurückgeführt werden (WT: $5,5 \pm 0,2$, MLPko: $6,5 \pm 0,2$, MLPko+MLP-Flag: $5,0 \pm 0,1$). In der Echokardiographie konnte durch die Überexpression von MLP-Flag eine Verbesserung der Herzfunktion in MLP-defizienten Mäusen erreicht werden. Das Fractional Shortening verbesserte sich von $37 \pm 4\%$ auf $54 \pm 3\%$. Auf molekularer Ebene waren die Vertreter des hypertrophen Genprogramms konsistent zu den funktionellen Daten ebenfalls normalisiert.

Zusammenfassend konnten wir durch die Analyse des Genexpressionsprofils gedehnter Kardiomyozyten ein dehnungsabhängiges Muster herausarbeiten, das sich klar unterscheidet von dem Genexpressionsprofil pharmakologisch stimulierter Zellen. Wir konnten weiterhin zeigen, dass das dehnungsabhängige Genprogramm zumindest teilweise durch den Angiotensin-Rezeptor-Signalweg aktiviert werden kann. Ob sich der Angiotensin-Rezeptor damit in Zukunft als neuer Bestandteil des „Stretch“-Rezeptors etablieren wird, wird Gegenstand weiterer Studien sein. Das in die Mechanorezeption eingebundene Protein MLP,

wird durch Dehnung gegenregulatorisch hochreguliert. Eine adenovirale Überexpression von MLP in Kardiomyozyten hat eine antihypertrophe Wirkung. In vivo verursachte die herzspezifische Überexpression von MLP zunächst keinen offensichtlichen Phänotyp, so dass künftig ein potentieller antihypertropher und kardioprotektiver Effekt in Stress-Modellen wie aortale Konstriktion oder kontinuierliche Verabreichung hypertroph wirksamer Pharmaka untersucht werden sollte.